

# 弧菌几丁质降解代谢及调控机理的研究进展\*

王宏伟<sup>1\*\*</sup> 袁琳<sup>2\*\*</sup>

(武汉理工大学资源与环境工程学院 武汉 430070) (武汉理工大学生物材料与工程研究中心 武汉 430070)

**摘要** 对近年来在弧菌中几丁质降解代谢的主要过程及调控机理方面的研究进行了综述,指出弧菌降解几丁质主要分为 3 个步骤,几丁质的水解、几丁寡糖和 N-乙酰基葡萄糖胺的运输、几丁二糖和 N-乙酰基葡萄糖胺-6-磷酸的进一步降解等,且此过程的许多环节均受到二元信号传导系统的调控。

**关键词** 几丁质,弧菌,降解代谢,二元信号传导系统

中图分类号:Q93 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)05-0982-04

## Proceeding of Chitin Degradation Metabolism and Regulation Mechanism in *Vibrios*\*

WANG Hong-Wei<sup>1\*\*</sup> YUAN Lin<sup>2\*\*</sup>

(School of Resources and Environmental Engineering, Wuhan University of Technology, Wuhan 430070)

(Biomedical Materials and Engineering Research Center, Wuhan University of Technology, Wuhan 430070)

**Abstract** The process and mechanism of chitin degradation in *Vibrios* were introduced in this paper by reviewing of recent progress in chitin catalytic cascade research. There exist three steps in chitin degradation, hydrolysis of chitin, transportation of chitin oligosaccharides and N-acetylglucosamine, and further degradation of chitobiose and N-acetylglucosamine-6-phosphate. Most of the reactions in chitin degradation are regulated by two-component signal transduction system.

**Key words** Chitin, *Vibrio*, Degradation, Two-component signal transduction system

几丁质(chitin)亦称甲壳素,是由 N-乙酰基葡萄糖胺经由  $\beta(1,4)$ 糖苷键聚合而成的线型高分子。几丁质含量丰富,仅次于纤维素,据估算,地球上每年可产生  $10^{11}$  吨几丁质,它广泛存在于水生甲壳类、软体动物和节肢动物外壳中,如虾和螃蟹等。几丁质及其降解产物,已被广泛应用于医药、化工、食品、环境等众多领域。如:几丁寡糖可制成抗癌药品;寡聚糖用作化妆品中保湿乳液;利用它的抗菌和抑菌性能,可将其作为肥料的同时抑制土壤中病菌和细菌的生长。因此,了解几丁质及其降解产物对生物的作用具有十分重要的意义<sup>[1]</sup>。然而,由于目前主要是利用几丁质酶等来降解几丁质,技术还不成熟,无法达到彻底有效降解几丁质的目的。人类将大量富含几丁质的物质作为垃圾处理,不仅危害环境,同时极大浪费了资源。因此,有效开发利

用几丁质具有十分重要的经济价值和社会意义,是当前迫切需要解决的课题。几丁质生物代谢十分复杂,迄今为止,尚未确证其全部代谢过程,几丁质生物代谢过程在弧菌中研究的最为清楚,现以弧菌为例介绍其代谢几丁质的主要途径和调控模式。

## 1 几丁质的降解过程及机理

### 1.1 几丁质的降解过程

几丁质是高分子氨基多糖,其降解产物可为细胞提供能量以及作为合成代谢的原料,因此,许多生物都进化出可以利用几丁质的代谢系统。

然而,几丁质及其低聚糖的水溶性极差。只有经过一些物理、化学和酶法处理,生成短链的寡糖后,才能较好地溶于水。因此,生物利用几丁质时,首先要将几丁质降解为水溶性物质,再经细胞膜上

\* 武汉理工大学校基金资助项目(No. XJJ2004240)

\*\* 通讯作者 Tel 027-87392189, E-mail: drwanghongwei@sohu.com, yuanlin2001@sohu.com

所有作者对本文贡献相同

收稿日期:2007-01-12, 修回日期:2007-02-01

的转运机构运输至细胞内,在酶的作用下逐步分解寡糖,最后完全降解为二氧化碳和水(图1)。

此过程非常复杂,且涉及众多因素,较难在高等生物中的展开研究。随着基因组技术的发展,大量微生物的遗传信息得以破解,在微生物系统中几丁质的降解过程的研究也较为深入,尤其是在弧菌中,已经获得了大量与几丁质代谢密切相关的基因以及蛋白质的结构和功能信息。

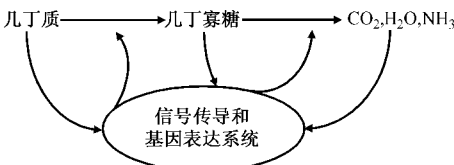


图1 生物降解几丁质过程示意图

弧菌利用几丁质的过程具有典型特征,从弧菌对几丁质类物质的寻找、附着开始,直至N-乙酰基葡萄糖胺脱乙酰基和脱氨基后成为果糖-6-磷酸进入三羧酸循环,都已发现了诸多证据。在这一复杂的过程中,几乎每一步反应都需要细胞进行精确的调控才能完成。因为几丁质并非理想的代谢原料,需要调动机体许多蛋白质的协同参与才能完成其降解过程,所以,这些参与降解过程的蛋白质的合成也都是在信号传导系统的控制下实现的。

1.2 细菌几丁质酶的主要类型

自从1905年Benecke首次报导了溶几丁质芽孢杆菌(*Bacillus chitinovorius*)能产生几丁质酶以来,已发现了许多产几丁质酶的微生物,包括细菌、放线菌和真菌等。其中,弧菌是一类产几丁质酶较多的微生物。

几丁质水解酶主要有2大类,几丁内切酶(Endochitinase)和几丁外切酶(Exochitinase)。内切酶(EC 3.2.1.14)识别几丁质的主链,可在分子内部的任意伸展部位水解几丁质链生成较短的几丁质分子,如几丁二糖、几丁三糖和几丁四糖等。外切酶分为两个亚类,几丁二糖酶(Chitobiosidase, EC 3.2.1.29)可以从几丁质的非还原端每隔二糖单位水解产生一个几丁二糖; $\beta$ -(1,4)-N-乙酰基葡萄糖胺酶( $\beta$ -(1,4)-N-acetyl glucosaminidase, EC 3.2.1.30)则水解几丁内切酶和几丁二糖酶的寡糖产物而生成N-乙酰基葡萄糖胺<sup>[2]</sup>。

依据氨基酸序列的相似性,几丁质降解酶可分为3大家族:Family 18、Family 19和Family 20糖基水

解酶<sup>[3]</sup>。其中,Family 18包含了细菌、真菌、病毒、动物和一些植物的几丁质酶;Family 19包括了植物I、II和III类几丁质酶以及某些链霉菌几丁质酶<sup>[4]</sup>。这两个家族几丁质酶的氨基酸序列、三维结构及催化机制都存在很大差别<sup>[5]</sup>。Family 20几丁质降解酶主要是细菌、链霉菌和人的 $\beta$ -N-乙酰基己糖胺酶( $\beta$ -N-acetylhexosaminidase)。

细菌几丁质酶可根据其催化结构域氨基酸序列的不同分成3个亚族:A亚族、B亚族和C亚族<sup>[6]</sup>。其中,A亚族几丁质酶在第三结构域的( $\alpha/\beta$ )8桶状结构的第七和第八 $\beta$ 链中插入了一个 $\alpha+\beta$ 折叠区,而B亚族和C亚族都没有这一结构<sup>[5]</sup>。

弧菌(*Vibrio*)是革兰氏阴性菌,共有100多种,是海洋生物圈中含量最丰富的微生物<sup>[7]</sup>。弧菌产生的均为Family 18几丁质酶。目前,弧菌属的费尼斯弧菌(*V. furnissii*)、副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)、创伤弧菌(*V. vulnificus*)、鲨鱼弧菌(*V. carchariae*)、鳗弧菌(*V. anguillarum*)以及霍乱弧菌(*V. cholerae*)等种群中的几丁质酶都已经得到了鉴定(见表1)。

表1 弧菌属产生的几丁质酶

种群	几丁质酶	文献
<i>Vibrio alginolyticus</i>	Chitinase B	Ohishi 等 <sup>[8]</sup>
<i>Vibrio anguillarum</i>	Chitinase A	Hirono 等 <sup>[9]</sup>
<i>Vibrio carchariae</i>	Chitinase A	Suginta 等 <sup>[10]</sup> ; Songsirithigul 等 <sup>[11]</sup>
<i>Vibrio cholerae</i>	Chitinase A	Folster & Connell <sup>[12]</sup>
<i>Vibrio harveyi</i>	Chitinase A	Svitil & Kirchmar <sup>[13]</sup>
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Chitinase A	Hirono 等 <sup>[9]</sup>
<i>Vibrio</i> sp. strain Fi 7	Chitinase A	Bendt 等 <sup>[14]</sup>
<i>Vibrio vulnificus</i>	Chitinase A	Wortman 等 <sup>[15]</sup>

1.3 弧菌中几丁寡糖和N-乙酰基葡萄糖胺的跨膜运输

弧菌属许多种群具有非常近的亲缘关系,特别是一些有关几丁质代谢的基因的同源性超过了70%。这里以费尼斯弧菌(*V. furnissii*)和霍乱弧菌(*V. cholerae*)为例介绍其几丁寡糖和单糖的跨膜运输途径。

Keyhani 等<sup>[16]</sup>发现用0.6 mmol/L的几丁寡糖诱导,可促进*V. furnissii*细胞外膜上一个分子量约为40kD大小的蛋白质的表达,其表达量与寡糖的聚

合度有关,几丁二糖的诱导效率最低,聚合度较高的几丁寡糖诱导效率较高。经缺失突变分析发现,该蛋白与细菌从环境中吸收几丁寡糖密切相关。比对蛋白质结构的结果表明,该蛋白属于孔蛋白(Porin),主要功能是帮助细菌从周围环境中吸收的几丁寡糖进入胞围腔中。

进入胞围腔的几丁寡糖需进一步运输到细胞质中才能完全降解。近年来研究发现,在弧菌基因组中存在一个特殊的基因簇,由多个开放阅读框前后相连而成,这些阅读框的表达方向相同,且均可被几丁寡糖诱导<sup>[17]</sup>。其中,有5个紧密连接的基因A、B、C、D和E经同源性分析显示均属于ABC转运蛋白(ATP-binding cassette transporter)。A亚基是分泌到胞围腔中的蛋白质,B、C、D和E亚基均为膜蛋白部分。此类蛋白质需ATP来完成主动运输,在细菌的抗药性和金属离子、多肽以及糖类的运输上具有重要作用。当细菌缺失A亚基后,无论细胞是否经过几丁寡糖的诱导,都无法将几丁二糖输送到细胞质内,因此,可以认为该转运蛋白负责几丁二糖穿越细胞质膜的内层膜并将其运输进入到细胞质中。

同时还发现,A亚基的缺失并不影响N-乙酰基葡萄糖胺的吸收,提示我们在细胞膜上还存在另外一个转运N-乙酰基葡萄糖胺的载体。经研究发现,和许多单糖的运输类似,细胞表达一个称为糖磷酸转移酶系统(phosphotransferase system,PTS),经过多个彼此接近的蛋白质的相互传递,把从PEP获得的磷酸基团转移到待转运的N-乙酰基葡萄糖胺分子上,从而将该物质运输到细胞质内。此步反应的产物是N-乙酰基葡萄糖胺-6-磷酸。转运N-乙酰基葡萄糖胺的PTS系统含有多个蛋白质组分,它们的表达可被外源添加的N-乙酰基葡萄糖胺所诱导。

因此,弧菌几丁寡糖和N-乙酰基葡萄糖胺的跨膜运输主要依赖于3类蛋白质的功能,它们分别是位于细胞外膜的孔蛋白和位于细胞质膜内层膜上的ABC转运蛋白以及PTS系统。经过内层膜进入细胞质的物质分别为几丁二糖和N-乙酰基葡萄糖胺-6-磷酸。

#### 1.4 胞内代谢酶类型

由于几丁二糖和N-乙酰基葡萄糖胺-6-磷酸均非卡尔文循环的合适底物,因此,只有进一步将它们降解后才可用于细菌的物质和能量代谢。通过

对弧菌,特别是霍乱弧菌基因组的分析发现,其编码的多种蛋白质都与几丁质的降解有关,其中包括几丁二糖磷酸化酶、几丁二糖水解酶、N-乙酰基葡萄糖胺激酶、N-乙酰基葡萄糖胺-1-磷酸变位酶、N-乙酰基葡萄糖胺-6-磷酸脱乙酰基酶和6-磷酸葡萄糖胺脱氨酶等<sup>[17,18]</sup>。这些蛋白质参与了几丁二糖和N-乙酰基葡萄糖胺-6-磷酸的进一步降解过程,从而生成了6-磷酸果糖,进入卡尔文循环。几丁二糖和N-乙酰基葡萄糖胺-6-磷酸在细胞内的降解过程如图2所示,是一个的由多种蛋白质参与的十分复杂的催化过程。

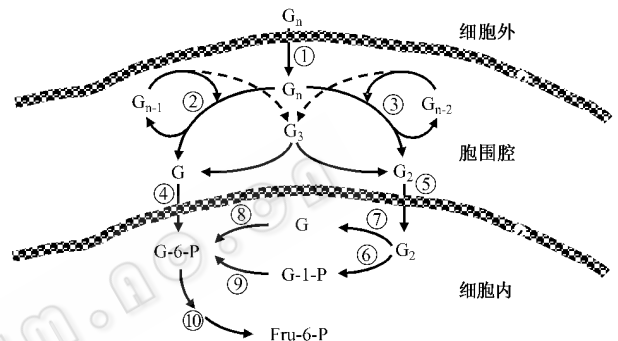


图2 几丁寡糖在弧菌细胞内的降解过程

图中G表示N-乙酰基葡萄糖胺,①~⑩分别表示在几丁寡糖降解作用中具有催化活性的蛋白质,它们分别是孔蛋白、 $\beta(1 \rightarrow 4)$ -N-乙酰基葡萄糖胺酶、几丁二糖酶、PTS系统、ABC转运蛋白、几丁二糖磷酸化酶、几丁二糖水解酶、N-乙酰基葡萄糖胺激酶、N-乙酰基葡萄糖胺-1-磷酸变位酶、N-乙酰基葡萄糖胺-6-磷酸脱乙酰基酶和6-磷酸葡萄糖胺脱氨酶等。

## 2 调控手段

由于几丁质不是弧菌理想的代谢底物,在进入卡尔文循环前的代谢过程需消耗大量的能量,因此,不是在特别需要的环境条件下,细胞内负责运输和降解几丁寡糖的蛋白质一般都处于较低的表达水平。当环境中缺少合适的碳源和氮源时,弧菌通过增加表达几丁质的降解酶系,选择利用环境中的几丁质来维持生存。这一过程是由信号传导系统介导完成的。

细菌基因组中最常见的信号传导系统是二元信号传导系统(Two-component signal transduction system)。该系统主要包括两大类蛋白质,分别为组氨酸激酶/磷酸化酶元件和响应元件,这两类蛋白质中的组氨酸和天门冬氨酸是蛋白质磷酸化的主要位点。有关二元信号传导系统的结构和功能有许

多综述都做了详尽的介绍<sup>[19]</sup>。几丁质的降解过程也受到该系统的调节。人们在链霉菌中发现,几丁质酶的表达是通过其上游的一个二元信号传导系统所调控的,它们 3 个组分形成了一个基因簇<sup>[20]</sup>。

费尼斯弧菌几丁质代谢基因簇的上游同样也存在一个组氨酸激酶/磷酸化酶元件。研究表明,该元件的缺失直接导致其下游的十个基因表达的减少,此现象与几丁寡糖的处理无关;然而在正常的野生菌种中,几丁寡糖诱导这十个基因表达表现出较好的浓度关系和糖链聚合程度关系<sup>[17]</sup>。可以推测,该组氨酸激酶/磷酸化酶元件应该是几丁寡糖降解代谢的调控组分。同时,研究还发现,N-乙酰基葡萄糖胺的处理与该元件的缺失或激活无关<sup>[18]</sup>,因此,还需进一步的实验了解 N-乙酰基葡萄糖胺降解的控制机理,以彻底揭示几丁质在弧菌中的代谢与调控过程。

### 3 结语

弧菌是目前研究几丁质代谢过程较多且较清楚的微生物,研究发现其对几丁质的降解过程十分复杂,需要经过几丁质的水解、几丁寡糖和 N-乙酰基葡萄糖胺的运输、几丁二糖和 N-乙酰基葡萄糖胺-6-磷酸的进一步降解作用才能完成,而该过程的多个环节都需要信号传导系统,特别是组氨酸激酶/磷酸化酶元件的控制来实现。尽管目前的研究工作还未充分揭示几丁质降解和调控的全部机理,但已经确定弧菌代谢几丁质的主要途径以及参与该过程的主要催化酶和信号调节元件,进一步的工作应该着重研究确定组氨酸激酶/磷酸化酶的信号分子,及其与信号分子相互作用后诱导几丁质代谢酶类表达的模式和过程。

### 参考文献

[1] Meibom K L, Blokesch M, Dolganov N A, *et al.* Science, 2005, **310** :

1824 ~ 1827.

- [2] Sahai A S, Manocha M S. FEMS Microbiology Reviews, 1993, **11** :317 ~ 338.
- [3] Henrissat B, Bairoch A. Biochemical Journal, 1993, **293** :781 ~ 788.
- [4] Hart P J, Pfluger H D, Monzingo A F, *et al.* Journal of Molecular Biology, 1995, **248** :402 ~ 413.
- [5] Suzuki K, Taiyoji M, Sugawara N, *et al.* Biochemical Journal, 1999, **343** :587 ~ 596.
- [6] Watanabe T, Kobori K, Miyashita K, *et al.* Journal of Biological Chemistry, 1993, **268** :18567 ~ 18572.
- [7] Thompson F L, Klose K E, AVIB Group. Journal of Bacteriology, 2006, **188**(13) :4592 ~ 4596.
- [8] Ohishi K, Murase K, Ohta T, Etoh H. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2000, **89**(5) :501 ~ 505.
- [9] Hirono I, Yamashita M, Aoki T. Journal of Applied Microbiology, 1998, **84** :1175 ~ 1178.
- [10] Suginta W, Vongsuwan A, Songsirithigul C, *et al.* Archives of Biochemistry and Biophysics, 2004, **424** :171 ~ 180.
- [11] Songsirithigul C, Yuvaniyama J, Robinson R C, *et al.* Acta Crystallographica Section F, 2005, **61** :895 ~ 898.
- [12] Folster J P, Connell T D. Journal of Bacteriology, 2002, **184**(8) :2225 ~ 2234.
- [13] Svitil A L, Kirchman D L. Microbiology, 1998, **144** :1299 ~ 1308.
- [14] Bendt A, Hüller H, Kammel U, *et al.* Extremophiles, 2001, **5** :119 ~ 126.
- [15] Wortman A T, Somerville C C, Colwell R R. Applied and Environmental Microbiology, 1986, **52**(1) :142 ~ 145.
- [16] Keyhani N O, Li X B, Roseman S. Journal of Biological Chemistry, 2000, **275**(42) :33068 ~ 33076.
- [17] Li X B, Roseman S. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, **101**(2) :627 ~ 631.
- [18] Meibom K L, Li X B, Nielsen A T, *et al.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, **101**(8) :2524 ~ 2529.
- [19] Stock A M, Robinson V L, Goudreau P N. Annual Review of Biochemistry, 2000, **69** :183 ~ 215.
- [20] Tsujibo H, Hatano N, Okamoto T, *et al.* FEMS Microbiology Letters, 1999, **181** :83 ~ 90.
- [21] Li X B, Yuan L, Wang H W, *et al.* ASM General Meeting, 2003, **103** :K-102.